

Hemadsorion Type2ウイルスのHeLa細胞-持続感染系 に於けるウイルス抗原の伝達様式の解析

著者	宮本 勉
号	257
発行年	1964
URL	http://hdl.handle.net/10097/17951

氏 名 ^{みや}宮 ^{もと}本 ^{つとむ}勉

授 与 学 位 医 学 博 士

学 位 授 与 年 月 日 昭和39年3月25日

学位授与の根拠法規 学位規則第5条第1項

研究科・専攻の名称 東北大学大学院医学研究科
内科学系

学 位 論 文 題 目 An Evidence of Intracellular Transfer
of Virus Antigen in a Carrier State of
Hemadsorption Type 2 Virus in HeLa
Cell Culture
(Hemadsorption Type 2 ウイルスの HeLa 細胞
- 持続感染系に於けるウイルス抗原の伝達様式の解
析)

指 導 教 官 東北大学教授 山 形 徹 一

論文審査委員 東北大学教授 石 田 名 香 雄

東北大学教授 葛 西 森 夫

論 文 内 容 要 旨

猿腎細胞で増殖したHA2 ウイルスをHeLa細胞に感染させた後、その細胞を少なくとも数代継代を重ねる事によつて出来上つたHeLa/HA2細胞は、次のような極めて特徴のあるウイルス持続感染系であることが、これ迄の研究で明らかにされて来た。即ちこの細胞系は抗体或いは干渉という特別な処理を加えることのない条件下で、HeLa細胞と同様の培養方法で同様の増殖率で継代保持出来るが、異つてゐるのはその系の細胞は少なくとも集団培養としてみた限り、すべての細胞内にHA2 ウイルス抗原を螢光抗体法で証明出来るという点である。しかも培養液中及び細胞内に赤血球凝集素の産生される事、その細胞は猿腎細胞へ1個の感染中心を示す事、又その表面は血球吸着を示す事、共通抗原をもつ仙台ウイルスに抵抗性を示す事等からみて、この細胞集団はHA2 ウイルスを一旦細胞内にとり込んだ後はそのウイルス抗原を合成しながら増殖を続けている事が明らかである。然し、このHeLa/HA2 細胞集団のすべての細胞は、各々独立に分裂しながら同時にウイルス抗原をも合成してゆくのか、或いはこの集団の一部の細胞のみがウイルス感染状態にあつて、感染後ウイルスを放出して同一培養中にある他の非感染細胞にも感染している結果、集団として観た場合すべての細胞がウイルス抗原の存在を示すのが明確な解析は得られていなかった。細胞クローン化法によつてこの点を実験的に解析したのが本研究である。

実 験 材 料 と 方 法

2年10カ月以上の期間、128代以上に亘り継代保持されたHeLa/HA2培養とHeLa細胞培養を実験に用いた。細胞クローン化法はPuck等の方法に従い、20%牛血清加Eagle培養液で37°CのCO₂ 恒温器(5%CO₂)内で行なつた。細胞内ウイルス抗原の証明はカバースリップ上に形成された細胞コロニーをアセトン固定後に螢光抗体補体法染色によつて行なつた。

実 験 結 果 及 び 考 察

先ずHeLa/HA2及びHeLaの培養を構成する細胞のコロニー形成効率は両者共に実験的に100%である事を認めた。次にHeLa/HA2とHeLaの細胞数を一定比率で混合して一枚のシャーレに接種した場合、形成されたコロニーは、ウイルス抗原保有細胞から成り立つコロニーと、全く抗原を含まぬ細胞から成り立つコロニーの2群に分けられるが、この数の比率は接種時の両者の細胞数の比率と一致する事をみた。即ちHeLa/HA2細胞から放出されているはずのウイ

ルスは、同一培養内で正常 HeLa 細胞へ全く感染する事なく両者の細胞は独立にクローン化されている事が示された。又抗ウイルス血清の存在下でクローン化された HeLa/HA2 細胞のすべては、ウイルス抗原保有細胞から成り立っている事も認められた。更に例えば Walker と Hinze の報告しているマンプスウイルス-ヒト結膜細胞持続感染系の様に、その細胞集団に非感染細胞が出現するか否かを、HeLa/HA2 の 759 のクローンについて検討したところ、例外なしにすべてのクローン細胞中にウイルス抗原が証明された。対照の HeLa 細胞の 142 のクローンのすべては陰性であつた。以上の実験結果から、HeLa/HA2 培養のすべての細胞はウイルス抗原を合成しながら分裂増殖を続けてゆく事が明らかになつた。このことは HeLa/HA2 という実験的につくりあげられたウイルス持続感染系の細胞は、HeLa 細胞の遺伝支配因子に HA2 ウイルスの遺伝支配因子が、分子レベルで極めて密接な結合関係を有している事を強く示唆する根拠を与えたものと考えられる。このように細胞集団レベルでなく、単細胞レベルで取り扱い得ることの実証されたウイルス・細胞持続感染系は、未だ他にその類をみない。

結 論

HeLa/HA2 持続感染系に含まれる細胞のすべては、その各々がウイルス抗原を合成しつつ分裂増殖を続けてゆく事を、細胞クローン化法によつて証明した。

審 査 結 果 の 要 旨

著者は HeLa/HA2 細胞集団のすべての細胞が、各々独立に分裂しながら同時にウイルス抗原をも合成してゆくのか、或いはこの集団の一部の細胞のみがウイルス感染状態にあつて、感染後ウイルスを放出して同一培養中にある他の非感染細胞にも感染している結果、集団として観た場合すべての細胞がウイルス抗原の存在を示すのか明確な解析は得られていないので、細胞クローン化法によつてこの点を実験的に解析し、次のような成績を得ている。

実験材料としては、2年10ヶ月以上の期間、128代以上に亘り継代保持された HeLa/HA2 培養と HeLa 細胞培養を実験に用い、細胞クローン化法は Puck 等の方法に従い、20% 牛血清加 Eagle 培養液で 37°C の CO₂ 恒温器 (5% CO₂) 内で行なつたが、細胞内ウイルス抗原の証明はカバースリップ上に形成された細胞コロニーをアセトン固定後に蛍光抗体補体法染色によつて行なつている。

先ず HeLa/HA2 及び HeLa の培養を構成する細胞のコロニー形成効率は両者共に実験的に 100% である事を認めたが、次に HeLa/HA2 と HeLa の細胞数を一定比率で混合して一枚のシャーレに接種した場合、形成されたコロニーは、ウイルス抗原保有細胞から成り立つコロニーと、全く抗原を含まぬ細胞から成り立つコロニーの2群に分けられ、この数の比率は接種時の両者の細胞数の比率と一致する事をみている。即ち HeLa/HA2 細胞から放出されているはずのウイルスは、同一培養内で正常 HeLa 細胞へ全く感染する事なく両者の細胞は独立にクローン化されている。又抗ウイルス血清の存在下でクローン化された HeLa/HA2 細胞のすべては、ウイルス抗原保有細胞から成り立っている。更にたとえば、Walker と Hinze の報告しているマンプスウイルス—ヒト結膜細胞持続感染系のように、その細胞集団に非感染細胞が出現する可否かを、HeLa/HA2 の 759 のクローンについて検討したところ、例外なしにすべてのクローン細胞中にウイルス抗原が証明されている。

以上の実験結果から、HeLa/HA2 培養のすべての細胞はウイルス抗原を合成しながら分裂増殖を続けてゆく事が明らかになつたが、このことは HeLa/HA2 という実験的に作りあげられたウイルス持続感染系の細胞は、HeLa 細胞の遺伝支配因子に HA2 ウイルスの遺伝支配因子が、分子レベルで極めて密接な結合関係を有している事を強く示唆する根拠を与えたものと考えられる。このように細胞集団レベルでなく、単細胞レベルで取り扱い得ることの実証されたウイルス—細胞持続感染系は、未だ他にその類をみない。

すなわち著者は HeLa/HA2 持続感染系に含まれる細胞のすべては、その各々がウイルス抗原を合成しつつ分裂増殖を続けてゆく事を細胞クローン化法によつて証明したこと結論している。従つて本論文は学位を授与するに値するものと認める。